

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

Molekulaar- ja rakubioloogia instituut

Bio- ja siirdemedit siini instituut

Füsioloogia osakond

Helis Guske

Katioonpumpade uurimine Wfs1-puudulikkusega hiirte südames ja neerudes

Magistritöö (30 EAP)

Geenitehnoloogia eriala

Juhendajad: Silva Sütt PhD

prof. Ants Kurg PhD

Alina Altpere MSc

TARTU 2016

Katioonpumpade uurimine Wfs1-puudulikkusega hiirte südames ja neerudes

Lühikokkuvõte: Wolframi sündroom on autosomaalne retsessiivne neurodegeneratiivne haigus, mida põhjustavad mutatsioonid volframiini kodeerivas *WFS1* geenis. Haigusele on iseloomulikud magediabeet, tüüp I suhkruhaigus, nägemisnärvi atroofia ja kurtus. Volframiin on transmembraanne endoplasmaatilises retiikulumis paiknev glükoproteiin. On näidatud volframiini interaktsiooni Na^+/K^+ -ATPaasi β_1 alaühikuga ning arvatakse, et volframiin on vajalik naatriumpumba alaühikute kokkupanekuks ja stabiilsuse tagamiseks. Lisaks osaleb volframiin kaltsiumi taseme regulatsioonis rakus, olles sarko/endoplasmaatilise retiikulumi Ca^{2+} -ATPaasi (SERCA) negatiivne regulaator. Käesolevas töös uurisime Na^+/K^+ -ATPaasi ja SERCA alaühikute valgu tasemeid Wfs1-puudulikkusega hiirte südames ja neerudes. Leidsime, et osade naatriumpumba alaühikute valgu tasemed on Wfs1-puudulikkusega hiirte südames ja neerudes muutunud võrreldes metsiktüüpi hiirtega. Need tulemused aitavad paremini seletada Wolframi sündroomiga patsientidel esinevaid häireid südame ja neerude normaalses töös.

Märksõnad: Na^+/K^+ -ATPaas, sarko/endoplasmaatilise retiikulumi Ca^{2+} -ATPaas, volframiin, Wolframi sündroom, Wfs1-puudulikkusega hiir

B470 Füsioloogia

Study of cation pumps in the hearts and kidneys of Wfs1-deficient mice

Abstract: Wolfram syndrome is an autosomal recessive neurodegenerative disorder caused by mutations in the *WFS1* gene. It is associated with diabetes mellitus, diabetes insipidus, optic atrophy and deafness. *WFS1* encodes an endoplasmic reticulum (ER)-resident transmembrane glycoprotein called wolframin. Wolframin is a molecular partner of sodium-potassium ATPase β_1 subunit and it is necessary for the stability and assembly of sodium-pump subunits. Wolframin is also involved in calcium homeostasis. Wolframin is the molecular partner of sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and it negatively regulates its expression. In this study we investigated the protein levels of both Na^+/K^+ -ATPase and SERCA in the hearts and kidneys of Wfs1-deficient mice and found that the protein levels of some sodium-pump subunits are altered in the hearts and kidneys of Wfs1-deficient mice. These results might explain the heart failure and kidney problems observed in Wolfram syndrome patients.

Keywords: Na^+/K^+ -ATPase, sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, wolframin, Wolfram syndrome, Wfs1-deficient mice

B470 Physiology

SISUKORD

SISUKORD	3
LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. <i>WFS1</i> iseloomustamine	7
1.1.1. Wolframi sündroom.....	7
1.1.2. <i>WFS1</i> geen ja wolframiini valk	8
1.2. Na^+/K^+ -ATPaas	9
1.2.1. Naatriumpump südames	11
1.2.2. Naatriumpump neerudes.....	11
1.3. Sarko/endoplasmaatilise retiikulumi Ca^{2+} -ATPaas	12
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	14
2.1. Uurimistöö eesmärgid	14
2.2. Materjal ja metoodika	14
2.2.1. Katseloomad	14
2.2.2. Südame ja neerude prepareerimine.....	14
2.2.3. Aktiivsuse määramine	15
2.2.4. Valgu eraldamine ja kudede fraksioneerimine	16
2.2.5. Immunoblot	16
2.3. Tulemused	17
2.3.1. ATPaasne aktiivsus südames.....	17
2.3.2. Na^+/K^+ -ATPaasi alaühikute ja SERCA2 valgu tase südame membraanis	18
2.3.3. Na^+/K^+ -ATPaasi alaühikute valgu tase südame tsütosoolis	20
2.3.4. ATPaasne aktiivsus neerus	21
2.3.5. Na^+/K^+ -ATPaasi alaühikute valgu tase neeru membraanis	22

2.3.6. Na^+/K^+ -ATPaasi alaühikute valgu tase neeru tsütosoolis.....	23
2.4. Arutelu	24
KOKKUVÕTE	27
SUMMARY	28
TÄNUAVALDUSED.....	29
KASUTATUD KIRJANDUS	30
Lihtlitsents	36

LÜHENDID

ADH	Antidiureetiline hormoon (<i>antidiuretic hormone</i>)
ANOVA	Dispersioonanalüüs (<i>Analysis of variance</i>)
ATP1A1	Na ⁺ /K ⁺ -ATPaasi α_1 alaühik
ATP1B1	Na ⁺ /K ⁺ -ATPaasi β_1 alaühik
BCA	Bitsinkoonhape (<i>bicinchoninic acid</i>)
DIDMOAD	<i>diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness</i> , magediabeet, tüüp I suhkrudiabeet, nägemisnärvi atroofia ja kurtus
DOC	deoksükolaat (<i>deoxycholate</i>)
EDTA	etüleendiamiintetraädikhape (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
GAPDH	Glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaas (<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
NMRI	Tuumamagnetresonantsuuringud (<i>nuclear magnetic resonance imaging</i>)
PBST	Fosfaatpuhvril soolade lahus ja 0.1 % Tween 20
PKC	Proteiin kinaas C (<i>protein kinase C</i>)
PTH	Parathormoon (<i>parathyroid hormone</i>)
PVDF	Polüvinüülideenfluoriid
RPT	Proksimaalne vääniline neerutoruke (<i>renal proximal tubule</i>)
SDS	Naatriumdodetsüülsulfaat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Naatriumdodetsüülsulfaat-polüakrüülamiid geelelektroforees
SERCA	Sarko/endoplasmaatilise retiikulumi Ca ²⁺ -ATPaas
SR	Sarkoplasmaatiline retiikulum (<i>sarcoplasmic reticulum</i>)
WFS1	Wolframi sündroomi 1 geen või valk inimesel
Wfs1	Wolframi sündroomi 1 geen või valk inimesest erineval liigil

SISSEJUHATUS

Wolframi sündroom on autosomaalne retsessiivne pärilik haigus, mida põhjustavad mutatsioonid wolframiini valku kodeerivas *WFS1* geenis. Sündroomile iseloomulikeks tunnusteks on suhkruhaiged, magedihaiged, nägemisnärv atroofia, kurtus, häired kusetrakti normaalses töös ning erinevad psühhiaatrilised haigused (Barrett *et al.*, 1995). Arvatakse, et heterosügootseid defektse alleeli kandjaid on populatsioonis umbes 1% ning neil on näidatud 26 korda suuremat riski haigestuda psühhiaatrilistesse haigustesse. Uuringud on näidanud, et tihti esinevad neil raskekujuline depressioon, psühhos, kalduvus enesetapule, meeleoluhäired ning vägivaldne käitumine (Swift ja Swift, 2000).

Na^+/K^+ -ATPaas ehk naatriumpump on rakumembraanis paiknev ensüüm, mis on võimeline pumpama naatriumi ja kaaliumi ioone läbi plasmamembraani. Selle tulemusena luuakse rakumembraanile elektrookeemiline potentsiaal (Lingrel ja Kuntzweiler, 1994). On näidatud, et naatriumpumba β_1 alaühik ning WFS1 valk interakteeruvad omavahel ning võib oletada, et WFS1 osaleb naatriumpumba kokkupanekul ja stabiilsuse tagamisel (Zatyka *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2010).

Sarko/endoplasmaatilise retiikulumi Ca^{2+} -ATPaas (SERCA) ehk kaltsiumpump on sarko/endoplasmaatilises retiikulumis paiknev ensüüm, mille ülesandeks on pumbata kaltsiumioone rakkude tsütosoolist sarkoplasmaatilise retiikulumi lumenisse. Varasemalt on näidatud WFS1 ja SERCA omavahelist interaktsiooni ning arvatakse, et WFS1 toimib kui SERCA negatiivne regulaator (Zatyka *et al.*, 2015).

Oleme varasemalt uurinud naatriumpumba erinevate alaühikute ekspresseerimise mRNA tasemel *Wfs1*-puudulikkusega hiirte südames ja neerudes ning leidnud sealt muutusi *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega. Sellest tulenevalt oli käesoleva töö eesmärgiks uurida Na^+/K^+ -ATPaasi ja sarko/endoplasmaatilise retiikulumi Ca^{2+} -ATPaasi alaühikute valgu taset neerudes ja südames homosügootsetel ja heterosügootsetel *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega, et välja selgitada WFS1 mõju Na-pumbale ja Ca-pumbale. Lisaks erinevate alatüüpide valgu muutustele vaatasime, kas ATPaaside aktiivsus *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel on muutunud, kuna pumba aktiivsus kirjeldab kõige paremini organismis toimuvaid füsioloogilisi muutusi.

Töö koostati Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas bio- ja siirdemeditsiini instituudis füsioloogia osakonnas.

1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. *WFS1* iseloomustamine

1.1.1. Wolframi sündroom

Wolframi sündroom (OMIM 222300) on haruldane neurodegeneratiivne häire, mida põhjustavad mutatsioonid volframiini kodeerivas *WFS1* geenis (Barrett *et al.*, 1995). On kirjeldatud üle 100 erineva *WFS1* mutatsiooni ning suurem osa neist asuvad geeni viimases ehk kaheksandas eksonis (Hofmann *et al.*, 2003). Sinna hulka kuuluvad raaminihkemutatsioonid, insertioonid, deletsioonid, *nonsense* ja *missense* mutatsioonid (Khanim *et al.*, 2001). Erinevate kirjeldatud mutatsioonide puhul pole leitud kindlat genotüüp-fenotüüp suhet (Hardy *et al.*, 1999).

Esmakordselt kirjeldasid 1938. aastal Wolfram ja Wagener seda haigust kui juveniilset suhkru-diabeeti koos tugeva nägemise nõrgenemisega (Wolfram ja Wagener, 1938). Wolframi sündroom mõjutab kesknärvisüsteemi, perifeerseid närve ning neuroendokriinkudet. Haigusele on iseloomulikud magediabeet (*diabetes insipidus*), tüüp I suhkru-diabeet (*diabetes mellitus*), nägemisnärvi atroofia ja kurtus, millest tuleneb sündroomi teine nimetus – DIDMOAD (*diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness*) (Khanim *et al.*, 2001). Magediabeedi (*diabetes insipidus*) puhul eristatakse kaht erinevat vormi. Neuroloogiline vorm on tsentraalne ning seotud vasopressiini ehk antidiureetilise hormooni (ADH) vähenenud tootmisega hüpotaalamuses, renaalse puhul on aga pärsitud vee tagasiimendumine neerutorukestes (Fenske ja Allolio, 2012). Tüüp I suhkru-diabeet (*diabetes mellitus*) on insuliin-sõltuv juveniilne diabeet, mille puhul on vähenenud insuliini sekretsioon. On näidatud, et insuliini tootvate pankrease β -rakkude ja neuronite hävimine Wolframi sündroomiga patsientidel võib olla seotud ER-stressiga, mis viib rakusurmani (Fonseca *et al.*, 2010).

Wolframi sündroomi puhul on lisaks psühhiaatrilistele haigustele nagu skisofreenia, bipolaarne häire ja depressioon kirjeldatud ka erinevaid neuroloogilisi häireid. Patsientidel võivad esineda kusetrakti atoonia, dementsus, epilepsia, ataksia (väikeaju ja seljaaju kahjustusest tingitud koordinatsiooni- ja tasakaaluhäired), nüstagmid (korrapäratud silmaliigutused ja silmatõmbused), lõhnataju vähenemine, perifeerne neuropaatia ja üldine vaimse arengu mahajäämus (Swift ja Swift, 2000). Tuumamagnetresonantsuuringute (*nuclear magnetic resonance imaging* – NMRI) käigus on Wolframi sündroomiga patsientidel leitud

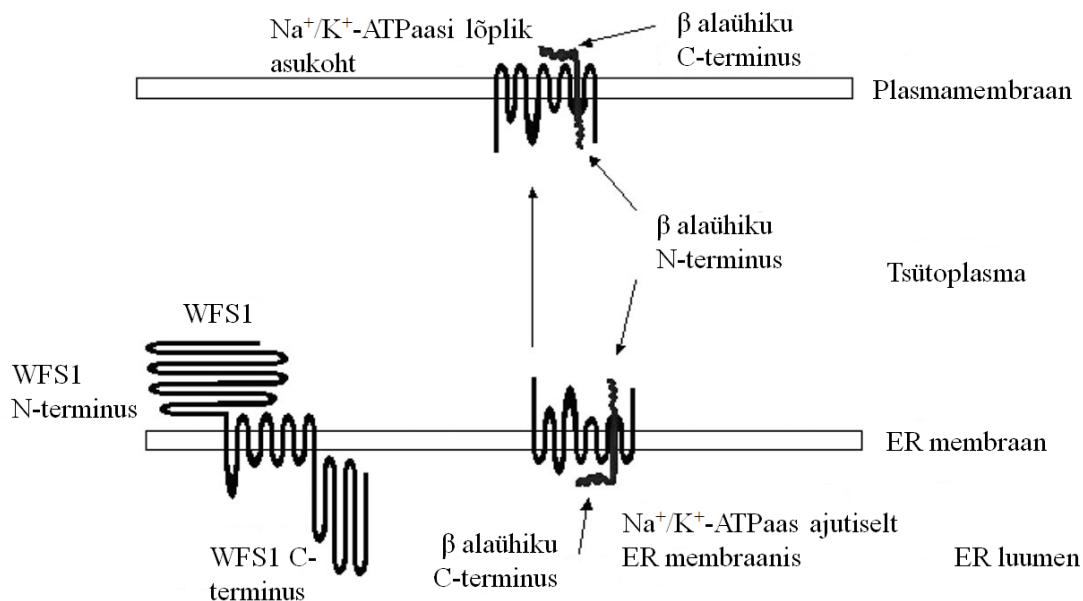
laiaulatuslikke atroofilisi muutusi üle terve aju, mis korreleeruvad sündroomile iseloomulike neuroloogiliste häiretega (Rando *et al.*, 1992). Lisaks on Wolframi sündroomi puhul kirjeldatud südamerütmihäireid, kuid on ebaselge, kas need on otseselt seotud volframiini funktsiooni ja ekspressiooniga südames või organismi üldise ebastabiilsusega (Smith *et al.*, 2004). Esimesed sümptomid, mis patsiendil tekivad, on suhkruhaigust ja optiline atroofia ning need on ühtlasi minimaalsed kriteeriumid, mille abil on võimalik diagnoosida Wolframi sündroomi (Strom *et al.*, 1998).

1.1.2. *WFS1* geen ja volframiini valk

Inimesel paikneb *WFS1* geen neljanda kromosoomi 4p16.1 lookuses ning hiirel viienda kromosoomi 5qB3 lookuses. *WFS1* geeni kogupikkuseks on 33,4 kb ning see koosneb kaheksast eksonist. Esimene ekson on mittekodeeriv ning kõige suurem on kaheksas ekson (2,6 kb), milles paikneb 60% kogu volframiini valku kodeerivast järjestusest (Strom *et al.*, 1998).

Volframiin on 890 aminohappe suurune ja 100 kDa molekulmassiga transmembraanne glükoproteiin, mis asub endoplasmaatilise retiikulumi (ER) membraanis (Strom *et al.*, 1998; Osman *et al.*, 2003). Tegemist on hüdrofoobse valguga, millel on üheksa transmembraanset segmenti ja pikad hüdrofiilsed regioonid mõlemas terminuses. Valgu N-terminaalne osa paikneb tsütoplasmas ning C-terminaalne osa ER luumenis (Hofmann *et al.*, 2003). Inimese ja hiire järjestuste vahel on näidatud kõrget homoloogiat: DNA tasemel 83% ning valgu tasemel 87% (Strom *et al.*, 1998).

WFS1 on kõrgelt ekspresseerunud erinevates kudedes üle terve organismi. Kõige enam leidub *WFS1* transkripte südames, ajus, skeletilihastes ja insuliini sekreteerivates pankrease β -rakkudes. Vähemal määral on see ekspresseerunud maksas, neerudes ja põrnas (Hofmann *et al.*, 2003). Valgu täpne funktsioon on siiani teadmata, kuid on teada, et *WFS1* on oluline Ca^{2+} taseme regulatsioonil ja ER-stressi vastuses (Fonseca *et al.*, 2010). Varasemalt on näidatud, et Na^+/K^+ -ATPaasi β_1 alaühik ja volframiini C-terminaalne ning transmembraanne regioon interakteeruvad omavahel ER luumenis (joonis 1). *Wfs1*-mutantsetes fibroblasti ja pankrease β -rakkudes on β_1 alaühiku ekspressioon vähenenud võrreldes normaalsete rakkudega ning naatriumpumba puudulikkus võib olla üheks pankrease β -rakkude hävimise põhjuseks, mille tulemusel väheneb ka insuliini sekretsioon. Arvatakse, et volframiinil on üldine soodustav roll oligomeersete valkude alaühikute kokkupanekul ja nende stabiilsuse tagamisel (Zatyka *et al.*, 2008).



Joonis 1. Na^+/K^+ -ATPaasi β_1 alaühiku ja WFS1 lokalisatsioon rakus. Naatriumpump funktsioneerib plasmamembraanis, kuid valmimise ja alaühikute (α ja β) kokkupaneku ajal paikneb see lühiajaliselt ER membraanis. WFS1 ja Na^+/K^+ -ATPaasi β_1 alaühiku omavaheline interaktsioon toimub kõige tõenäolisemalt ER lumenis (kohandatud Zatyka *et al.*, 2008).

Samuti on näidatud WFS1 interaktsiooni sarko/endoplasmaatilise retiikulumi Ca^{2+} -ATPaasiga (SERCA) ning arvatakse, et WFS1 käitub kui SERCA negatiivne regulaator. ER-stressi korral väheneb WFS1 ja SERCA omavaheline interaktsioon ning seega suureneb Ca^{2+} pumpamine ER lumenisse. See on kompensatoorseks mehhanismiks ER-stressist tingitud Ca^{2+} lekkimisele endoplasmaatilisest retiikulumist, hoides ära rakkude minemist apoptoosi. (Zatyka *et al.*, 2015).

1.2. Na^+/K^+ -ATPaas

Na^+/K^+ -ATPaas ehk naatriumpump on P-tüüpi ATPaaside klassi kuuluv valguline kompleks, mis transpordib naatriumi ja kaaliumi ioone. Iga kolme rakust välja pumbatud naatriumiooni kohta viiakse rakku sisse kaks kaaliumiooni ning energiaallikana kasutatakse selles protsessis ATP hüdrolyüsil vabanevat energiat (Lingrel ja Kuntzweiler, 1994). Selle tulemusena luuakse rakumembraanile elektrokeemiline gradient, mida on võimalik kasutada erinevate protsesside jaoks. Elektriline gradient on oluline rakkude puhkeolekupotentsiaali säilitamiseks ja signaaliülekaneks närvi- ja lihaskoes. Keemilist gradienti kasutatakse näiteks glükoosi ja naatriumi transpordiks rakkudesse (Tedeschi, 1974; Lingrel ja Kuntzweiler, 1994). Naatriumpump erineb teistest sama klassi pumpadest selle poolest, et teda on võimalik

spetsiifiliselt inhibeerida südame glükosiididega, näiteks ouabaiiniga (Tiger ja Fowler, 1991). Na^+/K^+ -ATPaas koosneb kahest katalüütilisest α alaühikust, kahest regulaatorsest β alaühikust ning FXYD2 valgust (Na^+/K^+ -ATPaasi γ alaühik) (Segall *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2011). Pumba töös on olulised ka teised FXYD valguperekonda kuuluvad valgud, mis reguleerivad pumba aktiivsust koe- ja isovormispetsiifiliselt (Geering *et al.*, 2003).

Katalüütiline α alaühik on oluline naatrium- ja kaaliumioonide seondumiseks ning tema koosseisu kuulub konserveerunud aspartaadijääk, mille kaudu toimub tema fosforüleerimine (Lingrel ja Kuntzweiler, 1994). α alaühikul on kirjeldatud nelja erinevat isovormi (α_1 , α_2 , α_3 , α_4), mille ekspressioon varieerub erinevates kudedes ja organismi arenguetappides. Kõige enam leidub organismis α_1 isovormi. α_2 ekspresseerub peamiselt lihastes, ajus ja südames. α_3 leidub põhiliselt neuronites, vähesel määral ka südames ning α_4 ekspressiooni on kirjeldatud ainult testistes (Segall *et al.*, 2001; McDonough *et al.*, 2002). On näidatud, et mõnel juhul on ühe isovormi puudulikkuse korral kompensatsiooniks suurenenud mõne teise isovormi ekspressioon. Näiteks on heterosügoostetel α_1 alaühiku puudulikkusega hiirtel tõusnud α_2 alaühiku ekspressioonitase (Magyar *et al.*, 1994).

Regulaatorse β alaühiku kaudu kinnitub pump raku plasmamembraani ning tema ülesandeks on seonduda α alaühikuga ja tagada pumba stabiilsus (Lingrel ja Kuntzweiler, 1994). Sarnaselt katalüütilisele alaühikule esineb ka regulaatorne β alaühik erinevate isovormidena (β_1 , β_2 ja β_3) (Therien ja Blostein, 2000; Kaplan, 2002). β_1 alaühik on ekspresseerunud organismi erinevates kudedes, β_2 peamiselt aju struktuurides ja lihastes ning β_3 kopsudes, maksas, skeletilihastes ja testistes (Appel *et al.*, 1996; Avila *et al.*, 1998; Tokhtaeva *et al.*, 2012).

Homosügootsed naatriumpumba α_1 alaühiku puudulikkusega hiired pole juba embrüonaalselt eluvõimelised ning α_2 alaühiku puudulikkusega hiired surevad sündides (James *et al.*, 1999). Samuti on näidatud, et homosügootsed β_2 alaühiku puudulikkusega hiired surevad 17-18 päeva vanuselt (Magyar *et al.*, 1994). Sellest lähtuvalt võib järeldada, et naatriumpump ja tema erinevate alaühikute ekspressioon on olulised juba väga varajastes organismi arenguetappides.

Naatriumpumba alaühikute erinevatel isovormidel on näidatud erinevat afiinsust naatrium- ja kaaliumioonide suhtes ning sellest tulenevalt ka erinevusi naatriumpumba aktiivsuses. Lisaks alaühikute koespetsiifilisele ekspressioonile mõjutavad naatriumpumba aktiivsust ka ko- ja post-translatsioonilised modifikatsioonid nagu näiteks alaühikute fosforüleerimine (Therien *et al.*, 1996). Valkude fosforüleerimine on laialt levinud meetod, kuidas pöörduvalt reguleerida ensüümide aktiivsust rakus. Na^+/K^+ -ATPaas on üks proteiin kinaas C (PKC) poolt fosforüleeritavatest valkudest ning rottidel on näidatud, et α_1 alaühiku fosforüleerimine Ser-23

positsioonist inhibeerib pumba transpordifunktsiooni ning seeläbi vähendab pumba aktiivsust (Vasilets *et al.*, 1997).

1.2.1. Naatriumpump südames

Südame normaalseks funktsioneerimiseks on oluline reguleerida rakusisese naatriumi hulka, mille eest vastutab põhiliselt naatriumpump. Na^+/K^+ -ATPaasi poolt tekitatud naatriumgradient tagab südames kiire aktsioonipotentsiaali tõusu. Iga aktsioonipotentsiaali ajal siseneb naatrium rakkudesse läbi pingest sõltuvate naatriumkanalite ning naatrium väljub uuesti rakust läbi Na^+/K^+ -ATPaasi. Tekkiv naatriumgradient on lisaks oluline $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -pumba tööks, seega mõjutab naatriumpump ka rakusisese kaltsiumi hulka ja seeläbi kaudselt reguleerib müokardi kontraktiilsust (Pavlovic *et al.*, 2007).

Hiire südames ekspresseeruvad põhiliselt Na^+/K^+ -ATPaasi α_1 ja β_1 isovormid ning lisaks neile madalamal tasemel ka α_2 ja β_2 . Inimese südames on lisaks leitud ka α_3 (McDonough *et al.*, 2002). On näidatud, et Na^+/K^+ -ATPaas kaitseb südant naatriumi ja kaltsiumi liia eest nii raku kui ka organi tasemel ning hoiab seeläbi ära südamerütmihäirete tekke. Häired naatriumpumba töös võivad viia erinevate südamehaiguste tekkeni nagu näiteks kardiomiopaatia ja südamerabandus (Pavlovic *et al.*, 2013b).

Na^+/K^+ -ATPaasi talitluse ja kardiomiopaatia vaheline seos on siiani küll veel ebaselge, kuid on näidatud, et südamepuudulikkuse korral on inimese südames naatriumpumba aktiivsus vähenenud. Samuti on α_1 , α_3 ja β_1 alaühikute ekspressioonitasemed normaalsest madalamad ning neid muutusi on täheldatud juba väga varajastes südamepuudulikkuse etappides (Schwinger *et al.*, 1999; Schwinger *et al.*, 2003). On näidatud, et naatriumpumba β_1 alaühikul on oluline roll südame kontraktiilsuse tagamisel ning β_1 isovormi puudulikkus viib südamepatoloogiate tekkele. Lisaks ei reageeri β_1 puudulikkusega hiirte süda ouabaiinile, mis tavaliselt toimib naatriumpumba inhibiitorina (Barwe *et al.*, 2009).

1.2.2. Naatriumpump neerudes

Neerudes vastutab naatriumpump rakuvälise vedeliku hulga ja vererõhu regulatsiooni eest (Pavlovic *et al.*, 2013a). Naatriumioonide tagasiimendumine neerutorukestes peab olema rangelt reguleeritud, et tagada normaalne rakkude homöostaas nagu näiteks ionide ja aminohapete transport. Proksimaalsetes väänilistes neerutorukestes (RPT) liigub naatrium rakkudesse Na^+/H^+ antipordi, $\text{Na}^+/\text{glükoos}$ kotranspordi, $\text{Na}^+/\text{fosfaadi}$ kotranspordi ja

Na^+ /aminohappe kotranspordi süsteemide kaudu. Na^+/K^+ -ATPaas vastutab nende pumpade tööks vajaliku naatriumgradiendi tekitamise eest (Al-Khalili *et al.*, 2004; Taub *et al.*, 2010).

Naatriumpumba aktiivsust reguleerivad mitmed efektormolekulid nagu näiteks dopamiin, parathormoon, angiotensiin II, norepinefriin ja prostaglandiin E_2 (Al-Khalili *et al.*, 2004). Proksimaalses väänilises neerutorukeses reageerivad rakud väga väikestele naatriumioonide hulga muutustele. Dopamiin ja parathormoon (*PTH*) vähendavad Na^+/K^+ -ATPaasi aktiivsust ning selle tulemusena naatriumioonide kontsentratsioon rakkudes suureneb. See omakorda võib viia rakusisese pH või kaltsiumisisalduse muutumisele (Kaplan, 2002; Taub *et al.*, 2010). Angiotensiin II, norepinefriin ja prostaglandiin E_2 aga stimuleerivad pumba tööd ning vähendavad naatriumioonide hulka rakkudes. Kui naatriumpumba regulatsioon proksimaalses väänilises neerutorukeses on häiritud, viib see lõpuks hüpertoonia tekkele (Wang *et al.*, 2009).

Neerudes ekspresseeruvad peamiselt naatriumpumba α_1 ja β_1 alaühikud (Taub *et al.*, 2010). On näidatud, et oksüdatiivse stressi korral väheneb Na^+/K^+ -ATPaasi α_1 alaühiku stabiilsus neerudes ning seeläbi on langenud naatriumpumba aktiivsus proksimaalses väänilises neerutorukeses (Thevenod ja Friedmann, 1999). Diabeedi, mis on üks Wolframi sündroomile iseloomulikke haigusi, korral on rottidel neerudes vähenenud naatriumpumba α_1 alaühiku ekspressioon (Nordquist *et al.*, 2010).

1.3. Sarko/endoplasmaatilise retiikulumi Ca^{2+} -ATPaas

Sarko/endoplasmaatilise retiikulumi Ca^{2+} -ATPaas ehk SERCA on P-tüüpi ATPaaside klassi kuuluv ensüüm, mis transpordib kaltsiumioone raku tsütosoolist sarkoplasmaatilise retiikulumi (SR) luumenisse. Energiaallikana kasutatakse selles protsessis ATP hüdroolüüsi energiat ning ühe ATP molekuli kohta transporditakse läbi membraani kaks Ca^{2+} -iooni. SERCA koosneb ühest polüpeptiidahelast suurusega 115 kDa ning ta lokaliseerub nii ER kui ka SR membraanis. SR on endoplasmaatilise retiikulumi analoog, mis leidub lihasrakkudes, kuid erinevalt ER-st on SR luumenisse võimalik ladustada millimolaarsetes kogustes kaltsiumi (Periasamy ja Kalyanasundaram, 2007).

Südamelihase kokkutõmbeks on vajalik rakusisese kaltsiumi vabanemine sarkoplasmaatilisest retiikulumist. Iga südamelöögi ajal suureneb kaltsiumi kontsentratsioon kardiomiotsüütide tsütosoolis umbes kümme korda (Marks, 2003). Kaltsiumioonide tagasi pumpamise eest SR luumenisse vastutab kaltsiumpump. Seega muutused SERCA ekspressioonis südames võivad olla põhjuseks südamepuudulikkuse ja südamerütmihäirete tekkel.

Selgroogsetes on leitud kolm erinevat SERCA kodeerivat geeni ning alternatiivse splaissimise tulemusena esinevad SERCA valgud rohkem kui 10 erineva isovormina. SERCA isovormide ekspressioon on koespetsiifiline ning nende ekspressioon muutub ka organismi arengu käigus. Serca1 geeni poolt kodeeritud Serca1a ja Serca1b ekspresseeruvad peamiselt kiiretes skeletilihaskiududes (Brandl *et al.*, 1987). Serca2 poolt kodeeritud Serca2a leidub peamiselt südames ja aeglastes lihaskiududes ning Serca2b ekspresseerub madalal tasemel organismi kõikides kudedes. Südamelihases on lisaks kirjeldatud ka Serca2c isovormi ekspressiooni (Dally *et al.*, 2006). Serca3 erinevaid isovorme on leitud mitmetes kudedes üle terve organismi, kuid lihaskoes on nende ekspressioon üldiselt madal. Mitmetes inimese kudedes ja rakutüüpides on mRNA tasemel kirjeldatud kuue erineva Serca3 isovormi ekspressiooni (3a-3f) (Dally *et al.*, 2009).

Nii täiskasvanud kui ka arenevas imetaja südames ekspresseerub peamiselt Serca2a isovorm. On näidatud, et Serca2a ekspressioon on oluline nii südame arenguks kui ka täiskasvanud südame kontraktsioon-lõdvestus tsükli toimimiseks. Südamepuudulikkus on tihti seotud vähenenud Ca^{2+} pumpamisega sarkoplasmaatilisse retiikulumi ning muutused Ca^{2+} transpordis viivad erinevate häireteni südame töös (Ver Heyen *et al.*, 2001; Periasamy ja Kalyanasundaram, 2007).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Uurimistöö eesmärgid

1. Uurida erinevate ATPaaside aktiivsust homosügootsete ja heterosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirte südames ja neerudes võrreldes metsiktüüpi loomadega.
2. Uurida Na⁺/K⁺-ATPaasi α_1 , fosforüleeritud α_1 , β_1 ja sarko/endoplasmaatilise retiikulumi Ca²⁺-ATPaasi SERCA2 valgu taset homosügootsete ja heterosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirte südame erinevates struktuurides võrreldes metsiktüüpi loomadega.
3. Uurida Na⁺/K⁺-ATPaasi α_1 , fosforüleeritud α_1 ja β_1 valgu taset homosügootsete ja heterosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirte neeru erinevates struktuurides võrreldes metsiktüüpi loomadega.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Katseloomad

Katseloomadeks olid emased Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditiini instituudi füsioloogia osakonnas valmistatud, paljundatud ja genotüpiseeritud F2 põlvkonna Wfs1-puudulikkusega homosügootsed ja heterosügootsed hiired (Luuk *et al.*, 2009) ja kontrolliks metsiktüüpi hiired. Katseloomade geneetiline taust oli (129/SVEVS6/tac x C57bl/6J) x (129/SVEVS6/tac x C57bl/6J). Loomade vanus oli 3-4 kuud. Hiiri hoiti puurides 8-10 kaupa 12-h/12-h valge/pime tsüklis 22°C juures ning valge tsükel algas kell 7.00 hommikul. Katseloomadel oli vaba ligipääs joogiveele ja toidule. Metsiktüüpi ja Wfs1-puudulikkusega hiirtega teostati katsed paralleelselt. Kõik läbiviidud katsed teostati Eesti Vabariigi põllumajandusministeeriumi poolt välja antud loa alusel (number 88, välja antud 25 august 2011).

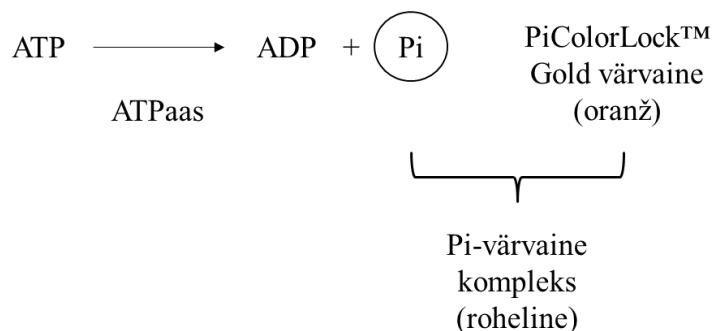
2.2.2. Südame ja neerude prepareerimine

Valkude analüüsiks surmati katseloomad tservikaalse dislokatsiooni teel. Seejärel eemaldati igalt hiirelt 1 terve neer ning süda, mis külmutati koheselt vedelas lämmastikus ja säilitati kuni proovide analüüsimiseni -80°C juures.

2.2.3. Aktiivsuse määramine

ATPaasse aktiivsuse leidmiseks homogeniseeriti koed sonikeerimise teel +4°C juures puhvis, mis sisaldas 0.32 M sahharoosi, 1 mM EDTA, 0.1% deoksükolaati (DOC) ja 37.5 mM Tris-HCl (pH 7.4). Saadud homogenaat tsentrifuugiti +4°C juures 10 000 g 10 minutit ning saadud supernatant fuugiti teistkordselt 30 minutit 24 000 g juures. Seejärel eemaldati supernatant ning membraanivalke sisaldav sade resuspendeeriti eelnevalt kirjeldatud puhvis ilma DOCita. Valgu kontsentratsiooni määramiseks ensüümpreparaadis kasutati Thermo Scientific BCA kitti (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) ning tulemused detekteeriti TECAN Sunrise Remote spektrofotomeetri ning Magellan V 7.2 programmiga 562 nm juures.

ATPaasse aktiivsuse määramiseks kasutati Innova Biosciences kitti (*ATPase assay kit nr 601-0120*, Innova Biosciences Ltd, Cambridge, UK). Tegemist on kolorimeetrilise analüüsiga, mis võimaldab kaudselt mõõta ensüümreaktsioonil tekkinud produkti hulka. ATPaasid kasutavad ionide transpordiks energiat, mis vabaneb ATP hüdroolüüsil ning selle tulemusena tekib anorgaaniline fosfaat. Vabanenud fosfaadi (Pi) hulka on võimalik määrata rohelist värvi kompleksi tekkega (joonis 2). Värvuse intensiivsus sõltub proovis oleva ATPaasi aktiivsusest.



Joonis 2. ATPaasi aktiivsuse määramise põhimõte.

Ensüümpreparaadist tehti 1000-kordsed lahjendused puhvis, mis sisaldas 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 4 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,15 mM CaCl₂ ja 20 mM KCl. Reaktsioon käivitati 3 mM lõppkontsentratsiooniga ATP lisamisega. Proove inkubeeriti 10 minutit 37°C juures ning reaktsioon lõpetati lisades proovidele *PiColorLock™ Gold mix* ning 2-minutilise vahega stabilisaator. Ekstinktsioonid mõõdeti 30 minutit pärast stabilisaatori lisamist 635 nm juures. Leidmaks vaba fosfaadi hulka reaktsioonisegus tehti paralleelne katse, kus reaktsioonil ei lastud toimuda ning leiti vahe reaktsiooni ja kontrollproovi vahel.

ATPaasne aktiivsus arvutati kasutades järgmist valemit:

$$\frac{\Delta Pi \cdot 1000}{500 \cdot 10} \div C = \mu mol Pi / min \cdot mg$$

ΔPi – fosfaadi (Pi) hulk uuritava proovi ja kontrollproovi vahel

1000 – ensüümpreparaadi lahjendus

10 – reaktsiooni aeg minutites

C – valgu hulk reaktsioonisegus (mg/ml)

Kõikide proovidega teostati võimalike vigade vähendamiseks mõõtmised kolmes korduses.

2.2.4. Valgu eraldamine ja kudede fraktsioneerimine

Western bloti jaoks homogeniseeriti koed sonikeerimise teel. Tsütosooli ja membraani eraldamiseks kasutati Thermo Scientific valkude fraktsioneerimise kitti (*Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues*, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) vastavalt etteantud protokollile. Lisaks proteaasi inhibiitorkokteilile lisati proovidele ka fosfataaside inhibiitorkokteili (Sigma). Tsütoplasma fraktsioonis sisalduvad tsütoplasmas lahustunud komponendid ning membraani fraktsioonis plasmamembraanis, mitokondrites ja ER/Golgis paiknevad valgud. Saadud fraktsioone säilitati kuni valkude analüüsimiseni -80°C juures. Valgu kontsentratsiooni määramiseks proovides kasutati Thermo Scientific BCA kitti (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) ning tulemused detekteeriti TECAN Sunrise Remote spektrofotomeetri ning Magellan V 7.2 programmiga 562 nm juures.

2.2.5. Immunoblot

Valguproovid lahutati 10% SDS-PAGE meetodil ning kanti seejärel üle PVDF membraanile. Membraane blokiti 5% piimapulbri PBST lahuses 45 minutit. Seejärel inkubeeriti membraane PBST-s spetsiifilise primaarse antikehaga (tabel 1) üleöö loksutil $+4^{\circ}\text{C}$ juures.

Tabel 1. Immunoblotis kasutatud primaarsed antikehad

Valk	Liik	Firma	Cat #	Lahjendus
ATP1A1	Hiir	Thermo Fisher Scientific	MA1-16731	1:5000
ATP1B1	Küülik	Thermo Fisher Scientific	PA5-29719	1:5000
ATP1A1 pSer23	Küülik	Thermo Fisher Scientific	PA5-35781	1:1000
SERCA2	Kits	Santa Cruz Biotechnology	Sc-8094	1:500
β-aktiin	Hiir	Santa Cruz Biotechnology	Sc-47778	1:1000
GAPDH	Küülik	Synaptic Systems	247002	1:10000

Membraane pesti 3x10 minutit PBST-s ja inkubeeriti toatemperatuuril loksutil 1 tund vastava fluorestseeruva sekundaarse antikehaga PBST-s (tabel 2).

Tabel 2. Immunoblotis kasutatud sekundaarsed antikehad

Antikeha liik	Antigeeni liik	Firma	Cat #	Lahjendus
Kits	Hiir	Jackson ImmunoResearch	115-625-145	1:30000
Kits	Küülik	Jackson ImmunoResearch	111-655-144	1:30000
Eesel	Kits	Jackson ImmunoResearch	705-655-147	1:30000

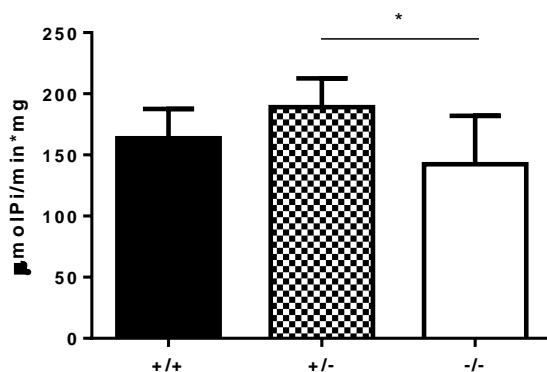
Membraane pesti veelkord 3x10 minutit PBST-s ning tulemuste detekteerimiseks kasutati Odyssey® CLx pildistamissüsteemi (LI-COR, Inc.) Valkude suuruse määramisel kasutati *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Scientific, #26634) markerit. Tulemusi analüüsiti kasutades Image Studio Lite (LI-COR, Inc.), Statistica versioon 10 (StatSoft, Inc., USA) ning GraphPad Prism versioon 6 tarkvara (GraphPad Software, Inc.). Huvipakkuva valgu hulka võrreldi kas β-aktiini või GAPDH hulgaga.

2.3. Tulemused

2.3.1. ATPaasne aktiivsus südames

Südames võrreldi kogu ATPaasset aktiivsust homosügootsetel ja heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega. Heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli südames ATPaasne aktiivsus võrreldes metsiktüüpi hiirtega tõusnud, kuid see erinevus ei olnud statistiliselt oluline ($F(2; 18)=4,276$; $p=0,276$). Homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli võrreldes metsiktüüpi hiirtega ATPaasne aktiivsus südames langenud, kuid see erinevus polnud statistiliselt oluline ($F(2; 18)=4,276$; $p=0,397$). Oluline

erinevus ATPaases aktiivsuses südames esines heterosügootsete ja homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirte vahel ($F(2; 18)=4,276$; $p=0,0237$) (joonis 3).



Joonis 3. Kogu ATPaase aktiivsus südames homosügootsetel (-/-) ja heterosügootsetel (+/-) Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega (+/+). Igas grupis oli 7 looma.

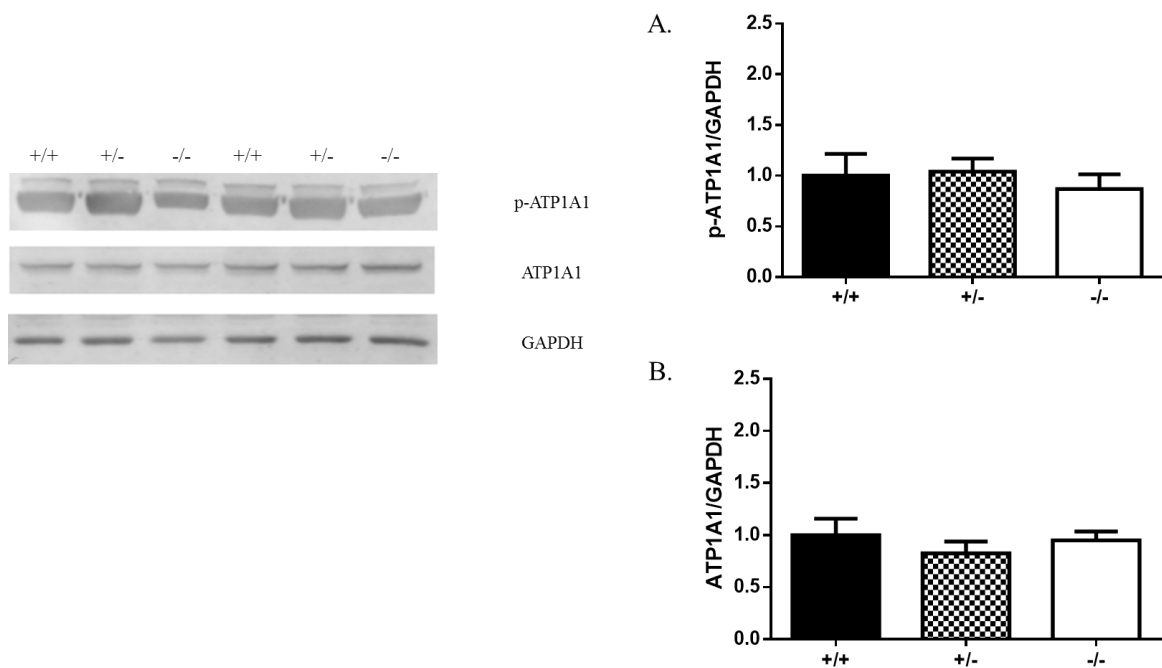
* - $p < 0.05$ (Tukey HSD test peale ühesuunalist ANOVAt).

2.3.2. Na^+/K^+ -ATPaasi alaühikute ja SERCA2 valgu tase südame membraanis

Südame membraanis võrreldi naatriumpumba α_1 , Ser23 fosforüleeritud α_1 , β_1 alaühikute ja SERCA2 valgu taset homosügootsetel ja heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega ning metsiktüüpi hiirtel.

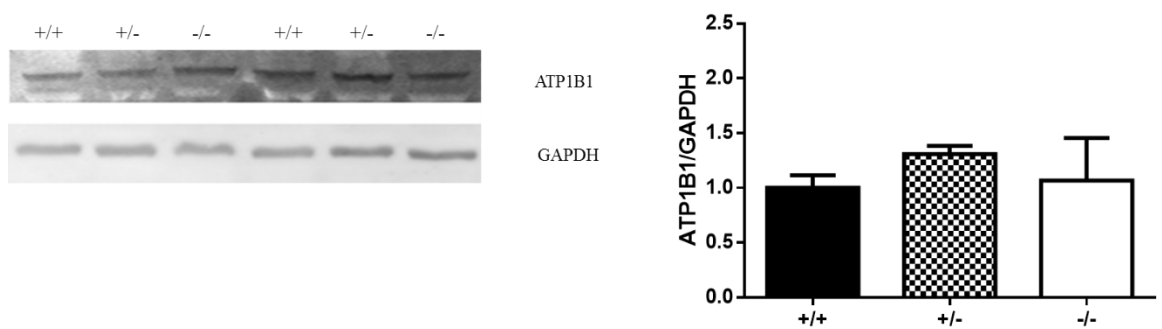
Fosforüleeritud α_1 alaühiku valgu tasemes südame membraanis polnud genotüüpide vahel statistiliselt olulisi erinevusi ($F(2; 15)=1,535$; $p=0,248$) (joonis 4A).

Na^+/K^+ -ATPaas α_1 alaühiku valgu tase südame membraanis oli heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega madalam, kuid see erinevus ei olnud statistiliselt oluline ($F(2; 15)=3,001$; $p=0,0724$). Homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli naatriumpumba α_1 alaühiku valgu tase südame membraanis võrreldav metsiktüüpi hiirtega ($F(2; 15)=3,001$; $p=0,732$). Homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirte α_1 alaühiku valgu tase südame membraanis oli võrreldes heterosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega veidi kõrgem, kuid see erinevus ei olnud statistiliselt oluline ($F(2; 15)=3,001$; $p=0,217$) (joonis 4B).



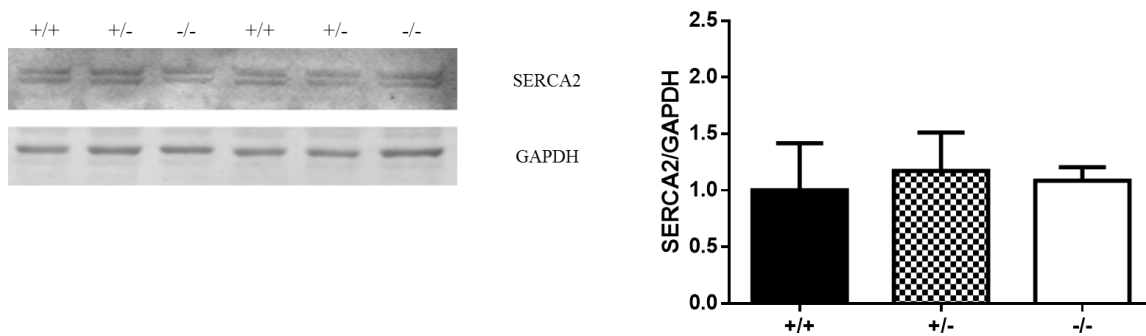
Joonis 4. Na^+/K^+ -ATPaas fosforüleeritud α_1 alaühiku (A) ja kogu α_1 alaühiku (B) valgu tase südame membraanis homosügootsetel (-/-) ja heterosügootsetel (+/-) Wfs1-puudulikkusega ning metsiktüüpi (+/+) hiirtel. Igas grupis oli 5-7 looma.

Na^+/K^+ -ATPaas β_1 alaühiku valgu tasemes polnud südame membraanis genotüüpide vahel statistiliselt olulisi erinevusi ($F(2; 6)=1,379$; $p=0,322$) (joonis 5).



Joonis 5. Na^+/K^+ -ATPaas β_1 alaühiku valgu tase südame membraanis homosügootsetel (-/-) ja heterosügootsetel (+/-) Wfs1-puudulikkusega ning metsiktüüpi (+/+) hiirtel. Igas grupis oli 3 looma.

Sarko/endoplasmaatilise retiikulumi Ca^{2+} -ATPaasi SERCA2 valgu tasemes südame membraanis polnud genotüüpide vahel statistiliselt olulisi erinevusi ($F(2; 14)=0,406$; $p=0,674$) (joonis 6).



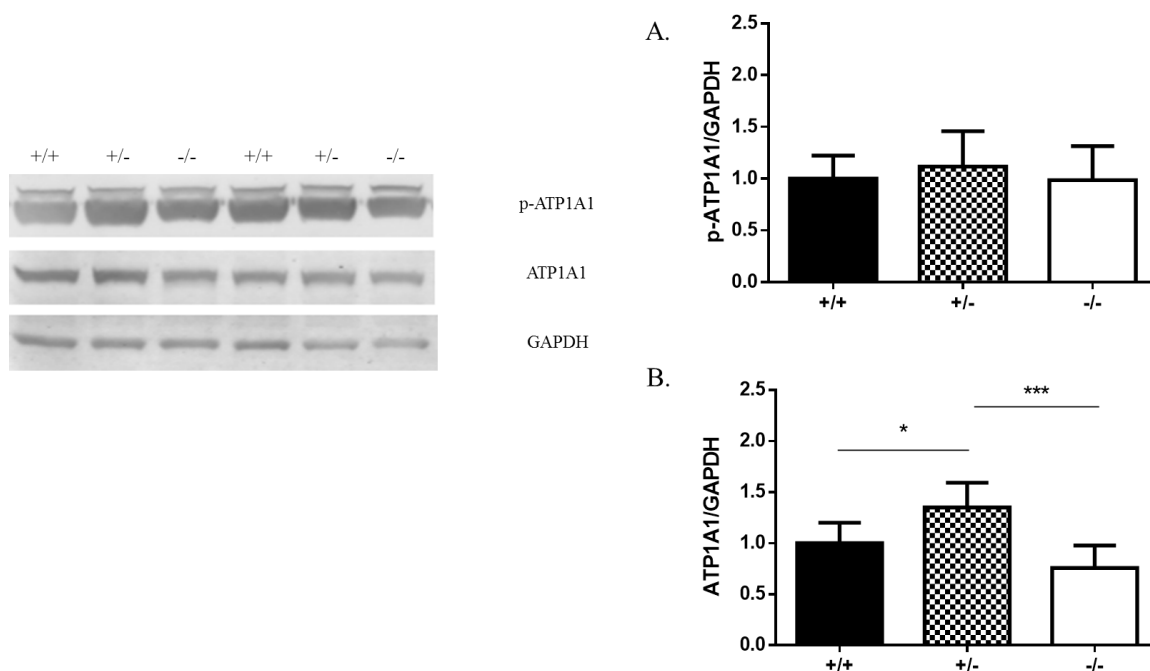
Joonis 6. Sarko/endoplasmaatilise retiikulumi Ca^{2+} -ATPaasi SERCA2 valgu tase südame ER membraanis homosügootsetel (-/-) ja heterosügootsetel (+/-) Wfs1-puudulikkusega ning metsiktüüpi (+/+) hiirtel. Igas grupis oli 5-6 looma.

2.3.3. Na^+/K^+ -ATPaasi alaühikute valgu tase südame tsütosoolis

Südame tsütosoolis võrreldi naatriumpumba α_1 ja Ser23 fosforüleeritud α_1 alaühiku valgu taset homosügootsetel ja heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega ning metsiktüüpi hiirtel.

Fosforüleeritud α_1 alaühiku valgu tasemes südame tsütosoolis puudus genotüüpide vahel statistiliselt oluline erinevus ($F(2; 15)=0,3099$; $p=0,738$) (joonis 7A).

Heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli Na^+/K^+ -ATPaasi α_1 alaühiku valgu tase südame tsütosoolis võrreldes metsiktüüpi hiirtega tõusnud ning see erinevus oli statistiliselt oluline ($F(2; 18)=11,41$; $p=0,0288$). Homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli naatriumpumba α_1 alaühiku valgu tase südame tsütosoolis võrreldes metsiktüüpi hiirtega madalam, kuid see erinevus ei olnud statistiliselt oluline ($F(2; 18)=11,41$; $p=0,0946$). Homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirte α_1 alaühiku valgu tase südame tsütosoolis oli võrreldes heterosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega madalam ning see erinevus oli statistiliselt oluline ($F(2; 18)=11,41$; $p=0,00054$) (joonis 7B).



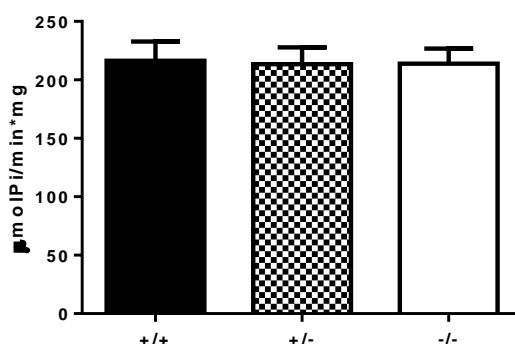
Joonis 7. Na^+/K^+ -ATPaas fosforüleeritud α_1 alaühiku (A) ja kogu α_1 alaühiku (B) valgu tase südame tsütosoolis homosügootsetel (-/-) ja heterosügootsetel (+/-) Wfs1-puudulikkusega ning metsiktüüpi (+/+) hiirtel. Igas grupis oli 5-8 looma.

* - $p < 0.05$ (Tukey HSD test peale ühesuunalist ANOVAt).

*** - $p < 0.001$ (Tukey HSD test peale ühesuunalist ANOVAt)

2.3.4. ATPaasne aktiivsus neerus

Neerudes võrreldi kogu ATPaasset aktiivsust homosügootsetel ja heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega ning genotüüpide vahel statistiliselt olulist erinevust ei leitud ($F(2; 19) = 0,0751$; $p = 0,928$) (joonis 8).



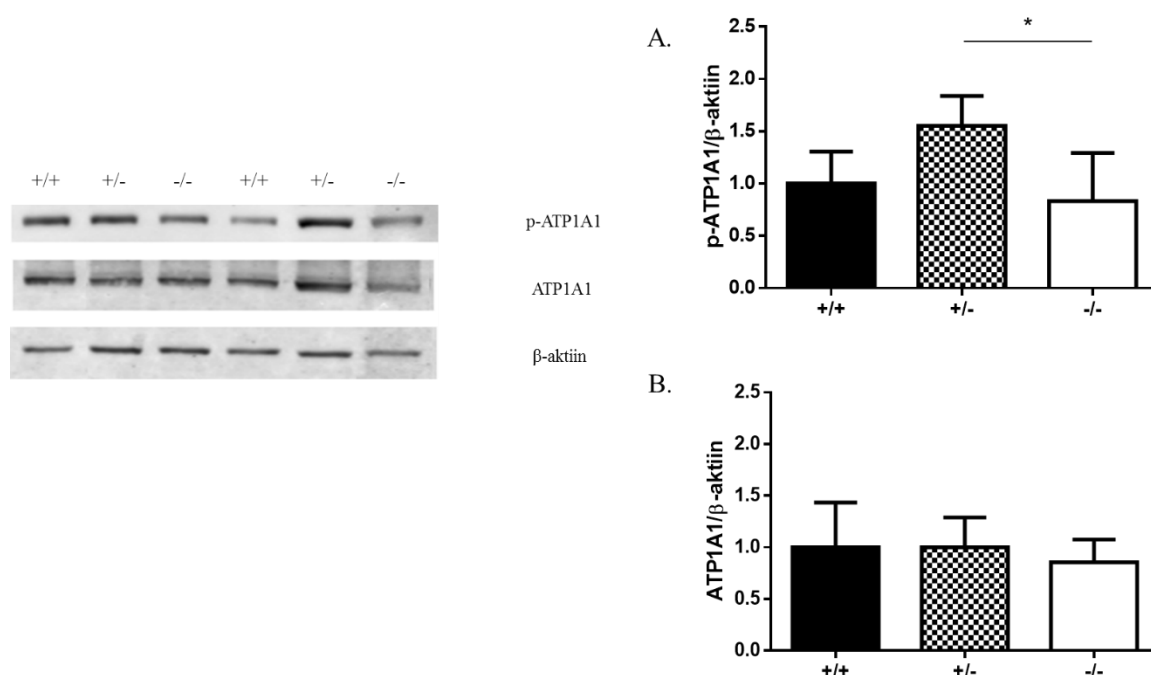
Joonis 8. Kogu ATPaasne aktiivsus neerudes homosügootsetel (-/-) ja heterosügootsetel (+/-) Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega (+/+). Igas grupis oli 7 looma.

2.3.5. Na^+/K^+ -ATPaasi alaühikute valgu tase neeru membraanis

Neerude membraanis võrreldi naatriumpumba α_1 ja Ser23 fosforüleeritud α_1 alaühikute valgu taset homosügootsetel ja heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega ning metsiktüüpi hiirtel.

Heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli Na^+/K^+ -ATPaasi fosforüleeritud α_1 alaühiku tase neeru membraanis võrreldes metsiktüüpi hiirtega tõusnud, kuid see erinevus ei olnud statistiliselt oluline ($F(2; 13)=5,713$; $p=0,0565$). Homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli neeru membraanis naatriumpumba fosforüleeritud α_1 alaühiku valgu tase võrreldes metsiktüüpi hiirtega langenud, kuid see erinevus ei olnud statistiliselt oluline ($F(2; 13)=5,713$; $p=0,721$). Homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli võrreldes heterosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega naatriumpumba fosforüleeritud α_1 alaühiku valgu tase neeru membraanis madalam ning see erinevus oli statistiliselt oluline ($F(2; 13)=5,713$; $p=0,0175$) (joonis 9A).

Na^+/K^+ -ATPaasi α_1 alaühiku valgu tasemes neeru membraanis ei esinenud genotüüpide vahel statistiliselt olulist erinevust ($F(2; 19)=0,458$; $p=0,639$) (joonis 9B).



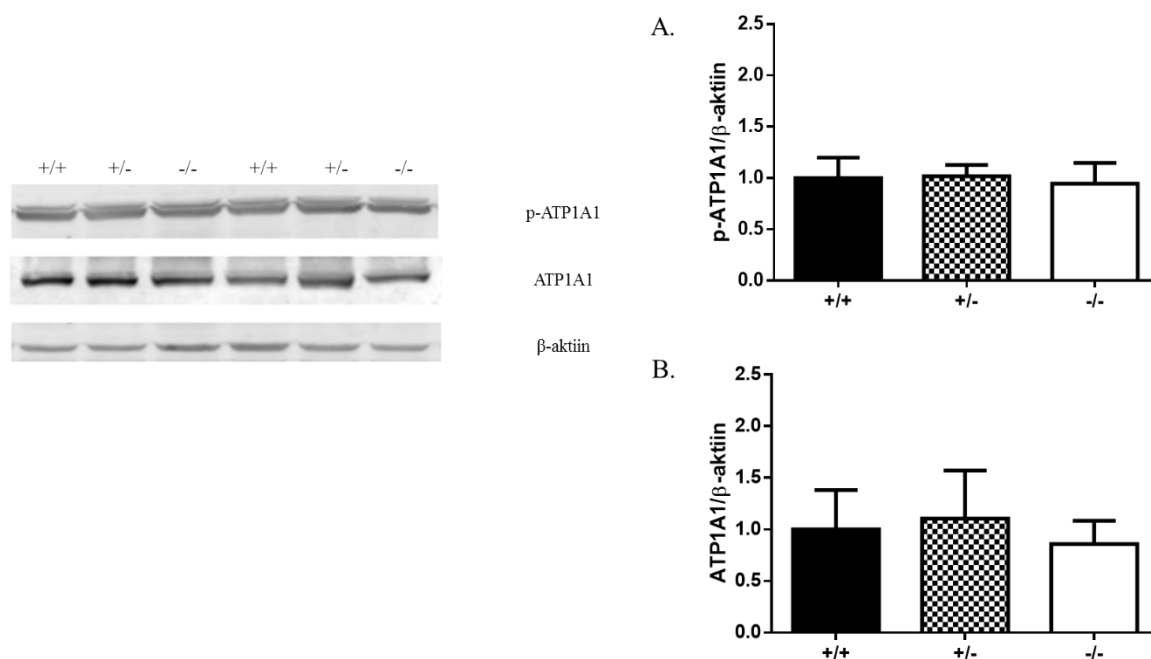
Joonis 9. Na^+/K^+ -ATPaas fosforüleeritud α_1 alaühiku (A) ja kogu α_1 alaühiku (B) valgu tase neeru membraanis homosügootsetel (-/-) ja heterosügootsetel (+/-) Wfs1-puudulikkusega ning metsiktüüpi (+/+) hiirtel. Igas grupis oli 5-8 looma.

* - $p<0.05$ (Tukey HSD test peale ühesuunalist ANOVAt).

2.3.6. Na⁺/K⁺-ATPaasi alaühikute valgu tase neeru tsütosoolis

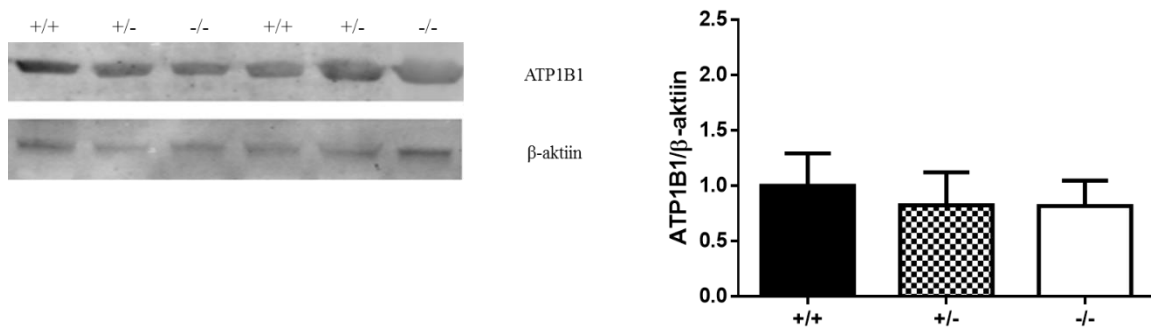
Neerude tsütosoolis võrreldi naatriumpumba α_1 , Ser23 fosforüleeritud α_1 ja β_1 alaühikute valgu taset homosügootsetel ja heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega ning metsiktüüpi hiirtel.

Fosforüleeritud α_1 alaühiku valgu tasemes neeru tsütosoolis puudus genotüüpide vahel statistiliselt oluline erinevus ($F(2; 15)=0,279$; $p=0,761$) (joonis 10A). Samuti puudus neeru tsütosoolis statistiliselt oluline erinevus genotüüpide vahel α_1 alaühiku valgu hulgas ($F(2; 19)=0,706$; $p=0,506$) (joonis 10B).



Joonis 10. Na⁺/K⁺-ATPaas fosforüleeritud α_1 alaühiku (A) ja kogu α_1 alaühiku (B) valgu tase neeru tsütosoolis homosügootsetel (-/-) ja heterosügootsetel (+/-) Wfs1-puudulikkusega ning metsiktüüpi (+/+) hiirtel. Igas grupis oli 6-8 looma.

Na-pumba β_1 alaühiku tasemes neeru tsütosoolis puudus genotüüpide vahel statistiliselt oluline erinevus ($F(2; 13)=0,735$; $p=0,611$) (joonis 11).



Joonis 11. Na^+/K^+ -ATPaas β_1 alaühiku valgu tase neeru tsütosoolis homosügootsetel (-/-) ja heterosügootsetel (+/-) Wfs1-puudulikkusega ning metsiktüüpi (+/+) hiirtel. Igas grupis oli 4-6 looma.

2.4. Arutelu

Käesolevas töös uurisime Na^+/K^+ -ATPaasi erinevate alaühikute valgu taseme muutusi Wfs1-puudulikkusega hiirte südame ja neeru rakkude tsütosoolis ja membraanides eesmärgiga kirjeldada, kas Na-pumba alaühikute muutustest võivad olla tingitud Wolframi sündroomiga patsientidel leitud häired südames ja neerudes. Varasemates katsetes on näidatud WFS1 valgu interaktsiooni naatriumpumba β_1 alaühikuga ning arvatakse, et tõenäoliselt toimub see ER-is (Zatyka *et al.*, 2008). Lisaks on näidatud WFS1 osalemist kaltsiumi taseme regulatsioonis läbi selle, et WFS1 interakteerub sarko/endoplasmaatilise retiikulumi Ca^{2+} -ATPaasiga (SERCA) ning toimib kui tema negatiivne regulaator (Zatyka *et al.*, 2015). Seega, võib WFS1 üheks rolliks olla rakkudes erinevate pumpade alaühikute kokkupanek ja stabiilsuse tagamine. Wolframi sündroomiga patsientidel on kirjeldatud südamepuudulikkust ja südamerütmihäireid (Smith *et al.*, 2004) ning võiks oletada, et suur roll nende haiguste tekkes on häiretel ioones tasakaalus. Wfs1 on südames kõrgelt ekspresseerunud (Hofmann *et al.*, 2003), samas ei ole teada Wfs1 funktsioon südames. On näidatud, et diabeet põhjustab südamepuudulikkust, mis võib olla seotud häiretega sarkoplasmaatilise retiikulumi Ca^{2+} regulatsioonis (Trost *et al.*, 2002). Sellest tulenevalt uurisime lisaks naatriumpumba alaühikutele ka südames kõige enam ekspresseeruva sarko/endoplasmaatilise retiikulumi Ca^{2+} -ATPaasi SERCA2 isovormi valgu taset ja üldist ATPaasset aktiivsust südames.

Varasemalt teostatud katsed füsioloogia instituudis ei tuvastanud Wfs1-puudulikkusega hiirte südames naatriumpumba α_1 alaühiku ekspressioonis erinevusi mRNA tasemel. Samas oli tõusnud β_1 alaühiku mRNA ekspressioon Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega (avaldamata andmed). Käesolevas töös teostasime uuringuid valgu tasemel ja leidsime, et α_1 alaühiku tase on tõusnud heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes metsiktüüpi ja homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega

südame tsütosoolis. β_1 alaühiku valgu koguses genotüüpide vahel erinevusi ei täheldanud ei südames ega neerudes. Hiljutised uuringud tõestasid, et Wfs1-puudulikkusega hiirtel on oimusagaras tõusnud nii naatriumpumba aktiivsus kui ka β_1 alaühiku mRNA tase, samas valgu tasemel muutusi ei täheldatud (Sutt *et al.*, 2015). Kuigi varasemalt on näidatud, et WFS1 interakteerub Na^+/K^+ -ATPaasi β_1 alaühikuga ning mõjutab pumba stabiilsust (Zatyka *et al.*, 2008), ei ole Wfs1-puudulikkuse korral märgata Na-pumba β_1 alaühiku ekspressiooni vähenemist ei aju, südames ega neerudes, mis näitab erinevate kompensatoorsete mehhanismide olemasolu.

Heterosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirte südames on üldine ATPaasne aktiivsus võrreldes metsiktüüpi loomadega tõusnud ning homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel vähenenud. Statistiliselt olulise erinevuse saime Wfs1-puudulikkusega heterosügootide ja homosügootide ATPaasi aktiivsuses. Südameglükosiidid seonduvad Na-pumba α alaühikuga ja inhibeervad Na^+/K^+ -ATPaasi aktiivsust, mille tulemusena suureneb Ca^{2+} tase rakus ja südame kontraktiilsus ja seetõttu kasutatakse glükosiide südamepuudulikkuse raviks (Schwinger *et al.*, 2003; Rahimtoola, 2004). Kui Wfs1-puudulikkuse korral on naatriumpumba aktiivsus vähenenud, siis selle tulemusena võib olla tõusnud Ca^{2+} -pumba SERCA aktiivsus ja suurenenud Ca-ioonide juurdevool sarkoplasmaatilisse retiikulumi. Seetõttu uurisime ka SERCA2 alaühiku valgu taset südame SR-s. Valgu tasemel me erinevusi ei täheldanud, kuid kindlasti on plaanis vaadata edaspidi kaltsiumpumba aktiivsust, kuna SERCA hulk ei pruugi peegeldada pumba aktiivsust. Naatriumpumba aktiivsuse vähenemine Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel võib olla seotud α_1 alaühiku üldise hulga vähenemisega rakus.

Neerudes on naatriumpumbal oluline roll naatriumi reabsorptsioonil tagamaks neerude normaalne funktsioneerimine. WFS1 mutatsioonide korral on leitud häireid neerude normaalses talitluses (Khanim *et al.*, 2001), seega uurisime Wfs1-puudulikkusega hiirtel naatriumpumba aktiivsust neerudes ja alaühikute valgu taset neeru tsütosoolis ja membraanis. Leidsime, et neeru membraanides on heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega märgatavalt tõusnud fosforüleeritud α_1 alaühiku tase. Statistiliselt olulise erinevuse leidsime aga heterosügootsete ja homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirte fosforüleeritud α_1 alaühiku valgu tasemes. Kogu α_1 alaühiku tase oli Wfs1-puudulikkusega hiirtel neeru membraanides küll mõnevõrra madalam kui metsiktüüpi hiirtel, kuid mitte oluliselt. Neeru tsütosoolis ei esinenud statistiliselt olulist erinevust ühegi uuritud alaühiku valgu tasemes erinevate genotüüpide vahel. Samuti ei tuvastanud me muutusi üldises ATPaases aktiivsuses genotüüpide vahel. Kuna neerudes on WFS1 ekspressioon madalam kui südames, siis võib olla, et WFS1 puudulikkus ei kajastu ka erinevuses pumpade aktiivsuses.

mRNA ekspressioonis oleme varasemalt näidanud, et homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel on võrreldes metsiktüüpi hiirtega α_1 ja β_1 alaühiku tase kõrgem võrreldes metsiktüüpi hiirtega (avaldamata andmed). Saadud tulemustest on näha, et α_1 alaühiku mRNA ekspressiooni suurenemine homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel ei peegeldu valgu tasemes. mRNA tasemel ekspressiooni suurenemine võib olla kompensatoorseks mehhanismiks säilitamaks naatriumpumba aktiivsust.

KOKKUVÕTE

Mutatsioonid volframiini kodeerivas *WFS1* geenis põhjustavad autosomaalset retsessiivset pärilikku haigust Wolframi sündroomi. On näidatud, et WFS1 mõjutab Ca^{2+} regulatsiooni ning osaleb ER-stressi vastuses interakteerudes sarko/endoplasmaatilise retiikulumi Ca^{2+} -ATPaasiga, olles tema negatiivseks regulaatoriks (Fonseca *et al.*, 2010; Zatyka *et al.*, 2015). Lisaks on kirjeldatud volframiini interaktsiooni Na^+/K^+ -ATPaasi β_1 alaühikuga (Zatyka *et al.*, 2008). Sellest tulenevalt uurisime käesolevas töös naatrium- ja kaltsiumpumba erinevate alaühikute valgu taset *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel ja heterosügootsetel hiirtel võrreldes metsiktüüpi loomadega. Uurisime naatriumpumba α_1 , fosforüleeritud α_1 , β_1 ja SERCA2 valgu taset hiirte südame struktuurides ning naatriumpumba α_1 , fosforüleeritud α_1 ja β_1 valgu taset hiire neeru struktuurides. Lisaks uurisime südames ka üldist ATPaasset aktiivsust *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel ja heterosügootsetel hiirtel võrreldes metsiktüüpi loomadega.

Leidsime, et heterosügootsetel *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel oli südame tsütosoolis võrreldes metsiktüüpi loomadega märgatavalt tõusnud naatriumpumba α_1 alaühiku valgu tase samas kui homosügootsetel *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel oli α_1 alaühiku tase oluliselt langenud. Teiste alaühikute valgu tasemes südame erinevates struktuurides me olulisi muutusi ei tuvastanud. Üldine ATPaasne aktiivsus südames oli homosügootsetel *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel oluliselt madalam kui heterosügootsetel *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel ning mõnevõrra madalam metsiktüüpi loomadest.

Neerude membraanis leidsime olulise languse naatriumpumba fosforüleeritud α_1 alaühiku valgu tasemes homosügootsetel *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel võrreldes heterosügootsete *Wfs1*-puudulikkusega loomadega ning mõnevõrra madalam oli valgu tase ka võrreldes metsiktüüpi loomadega. Teistes naatriumpumba alaühikutes me neeru erinevates struktuurides muutusi ei tuvastanud, samuti ei esinenud genotüüpide vahel erinevusi üldises ATPaases aktiivsuses.

Edaspidi on plaanis uurida naatriumpumba alaühikutest ka β_1 valgu taset südame ja neeru erinevates struktuurides *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel ja metsiktüüpi hiirtel eesmärgiga kirjeldada täpsemalt naatriumpumba erinevate isovormide funktsioone. Samuti on lisaks üldisele ATPaasele aktiivsusele plaanis uurida nii naatrium- kui ka kaltsiumpumba aktiivsust *Wfs1*-puudulikkusega hiirte südames ja neerudes.

Study of cation pumps in the hearts and kidneys of Wfs1-deficient mice

Helis Guske

SUMMARY

Wolfram syndrome is a rare autosomal recessive neurodegenerative disorder caused by mutations in the *WFS1* gene. It is associated with diabetes mellitus, diabetes insipidus, optic atrophy and deafness, hence the acronym, DIDMOAD (Khanim *et al.*, 2001). It was first described in 1938 by Wolfram and Wagener as juvenile onset diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram ja Wagener, 1938)

WFS1 encodes an endoplasmic reticulum (ER)-resident transmembrane glycoprotein called wolframin. It has been shown that wolframin is the molecular partner of sodium-potassium ATPase β_1 subunit and is necessary for the stability and assembly of sodium-pump subunits (Zatyka *et al.*, 2008; Gharanei *et al.*, 2013). Wolframin is also the molecular partner of sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA). It is thereby involved in calcium homeostasis by negatively regulating SERCA expression and ER Ca^{2+} intake (Zatyka *et al.*, 2015).

The aim of this work was to study the protein levels of different sodium-potassium ATPase and SERCA subunits in homozygous Wfs1-deficient mice and heterozygous Wfs1-deficient mice in comparison to wild-type mice. We analysed the overall ATPase activity and the protein levels of the Na^+/K^+ -ATPase α_1 , phosphorylated α_1 , β_1 and SERCA2 subunits in different structures of the mouse heart. In different structures of mouse kidney we analysed the overall ATPase activity and protein levels of α_1 , phosphorylated α_1 and β_1 subunits.

We found that the overall ATPase activity in the mouse heart was significantly higher in heterozygous Wfs1-deficient mice when compared to homozygous Wfs1-deficient mice and it was also slightly higher than the activity of wild-type mice. The same pattern was observed in the protein levels of sodium-potassium pump α_1 subunit in the heart cytosol and in the β_1 subunit in the heart membranes. There were no differences in the protein levels of other subunits in the different structures of the mouse heart.

The protein level of sodium-potassium pump phosphorylated α_1 subunit was significantly higher in heterozygous Wfs1-deficient mice kidney membranes when compared to homozygous Wfs1-deficient mice and also higher than the protein level of wild-type mice. We observed no differences in the protein levels of other sodium-pump subunits in the different structures of the mouse kidney.

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajaid, kelle asjakohased nõuanded ja igakülgne toetus olid suureks abiks käesoleva töö valmimisel. Lisaks avaldaksin tänu kogu bio- ja siirdemeditiini instituudi füsioloogia ja biokeemia osakondade töötajatele. Eraldi sooviksin tänada Kattri-Liis Esklat ja Anton Terasmaad. Suurim tänu minu perekonnale ja lähedastele, kes olid mulle igati toeks antud töö valmimise ajal.

KASUTATUD KIRJANDUS

Al-Khalili, L., Kotova, O., Tsuchida, H., Ehren, I., Feraille, E., Krook, A. ja Chibalin, A. V. (2004). ERK1/2 mediates insulin stimulation of Na(+),K(+)-ATPase by phosphorylation of the alpha-subunit in human skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 279, 25211-8.

Appel, C., Gloor, S., Schmalzing, G., Schachner, M. ja Bernhardt, R. R. (1996). Expression of a Na,K-ATPase beta 3 subunit during development of the zebrafish central nervous system. *J Neurosci Res* 46, 551-64.

Avila, J., Alvarez de la Rosa, D., Gonzalez-Martinez, L. M., Lecuona, E. ja Martin-Vasallo, P. (1998). Structure and expression of the human Na,K-ATPase beta 2-subunit gene. *Gene* 208, 221-7.

Barrett, T. G., Bunday, S. E. ja Macleod, A. F. (1995). Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet* 346, 1458-63.

Barwe, S. P., Jordan, M. C., Skay, A., Inge, L., Rajasekaran, S. A., Wolle, D., Johnson, C. L., Neco, P., Fang, K., Rozengurt, N., Goldhaber, J. I., Roos, K. P. ja Rajasekaran, A. K. (2009). Dysfunction of ouabain-induced cardiac contractility in mice with heart-specific ablation of Na,K-ATPase beta1-subunit. *J Mol Cell Cardiol* 47, 552-60.

Brandl, C. J., deLeon, S., Martin, D. R. ja MacLennan, D. H. (1987). Adult forms of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem* 262, 3768-74.

Dally, S., Bredoux, R., Corvazier, E., Andersen, J. P., Clausen, J. D., Dode, L., Fanchaouy, M., Gelebart, P., Monceau, V., Del Monte, F., Gwathmey, J. K., Hajjar, R., Chaabane, C., Bobe, R., Raies, A. ja Enouf, J. (2006). Ca²⁺-ATPases in non-failing and failing heart: evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2 isoform (SERCA2c). *Biochem J* 395, 249-58.

Dally, S., Monceau, V., Corvazier, E., Bredoux, R., Raies, A., Bobe, R., del Monte, F. ja Enouf, J. (2009). Compartmentalized expression of three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 isoforms including the switch to ER stress, SERCA3f, in non-failing and failing human heart. *Cell Calcium* 45, 144-54.

- Fenske, W. ja Allolio, B. (2012). Clinical review: Current state and future perspectives in the diagnosis of diabetes insipidus: a clinical review. *J Clin Endocrinol Metab* 97, 3426-37.
- Fonseca, S. G., Ishigaki, S., Osowski, C. M., Lu, S., Lipson, K. L., Ghosh, R., Hayashi, E., Ishihara, H., Oka, Y., Permutt, M. A. ja Urano, F. (2010). Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest* 120, 744-55.
- Geering, K., Beguin, P., Garty, H., Karlish, S., Fuzesi, M., Horisberger, J. D. ja Crambert, G. (2003). FXYD proteins: new tissue- and isoform-specific regulators of Na,K-ATPase. *Ann N Y Acad Sci* 986, 388-94.
- Gharanei, S., Zatyka, M., Astuti, D., Fenton, J., Sik, A., Nagy, Z. ja Barrett, T. G. (2013). Vacuolar-type H⁺-ATPase V1A subunit is a molecular partner of Wolfram syndrome 1 (WFS1) protein, which regulates its expression and stability. *Hum Mol Genet* 22, 203-17.
- Hardy, C., Khanim, F., Torres, R., Scott-Brown, M., Seller, A., Poulton, J., Collier, D., Kirk, J., Polymeropoulos, M., Latif, F. ja Barrett, T. (1999). Clinical and molecular genetic analysis of 19 Wolfram syndrome kindreds demonstrating a wide spectrum of mutations in WFS1. *Am J Hum Genet* 65, 1279-90.
- Hofmann, S., Philbrook, C., Gerbitz, K. D. ja Bauer, M. F. (2003). Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Hum Mol Genet* 12, 2003-12.
- James, P. F., Grupp, I. L., Grupp, G., Woo, A. L., Askew, G. R., Croyle, M. L., Walsh, R. A. ja Lingrel, J. B. (1999). Identification of a specific role for the Na,K-ATPase alpha 2 isoform as a regulator of calcium in the heart. *Mol Cell* 3, 555-63.
- Kaplan, J. H. (2002). Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem* 71, 511-35.
- Khanim, F., Kirk, J., Latif, F. ja Barrett, T. G. (2001). WFS1/wolframin mutations, Wolfram syndrome, and associated diseases. *Hum Mutat* 17, 357-67.
- Lingrel, J. B. ja Kuntzweiler, T. (1994). Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *J Biol Chem* 269, 19659-62.
- Luuk, H., Plaas, M., Raud, S., Innos, J., Sutt, S., Lasner, H., Abramov, U., Kurrikoff, K., Koks, S. ja Vasar, E. (2009). Wfs1-deficient mice display impaired behavioural adaptation in stressful environment. *Behav Brain Res* 198, 334-45.

- Magyar, J. P., Bartsch, U., Wang, Z. Q., Howells, N., Aguzzi, A., Wagner, E. F. ja Schachner, M. (1994). Degeneration of neural cells in the central nervous system of mice deficient in the gene for the adhesion molecule on Glia, the beta 2 subunit of murine Na,K-ATPase. *J Cell Biol* 127, 835-45.
- Marks, A. R. (2003). Calcium and the heart: a question of life and death. *J Clin Invest* 111, 597-600.
- McDonough, A. A., Velotta, J. B., Schwinger, R. H., Philipson, K. D. ja Farley, R. A. (2002). The cardiac sodium pump: structure and function. *Basic Res Cardiol* 97 Suppl 1, I19-24.
- Mishra, N. K., Peleg, Y., Cirri, E., Belogus, T., Lifshitz, Y., Voelker, D. R., Apell, H. J., Garty, H. ja Karlish, S. J. (2011). FXYD proteins stabilize Na,K-ATPase: amplification of specific phosphatidylserine-protein interactions. *J Biol Chem* 286, 9699-712.
- Nordquist, L., Shimada, K., Ishii, T., Furuya, D. T., Kamikawa, A. ja Kimura, K. (2010). Proinsulin C-peptide prevents type-1 diabetes-induced decrease of renal Na⁺-K⁺-ATPase alpha1-subunit in rats. *Diabetes Metab Res Rev* 26, 193-9.
- Osman, A. A., Saito, M., Makepeace, C., Permutt, M. A., Schlesinger, P. ja Mueckler, M. (2003). Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J Biol Chem* 278, 52755-62.
- Pavlovic, D., Fuller, W. ja Shattock, M. J. (2007). The intracellular region of FXYD1 is sufficient to regulate cardiac Na/K ATPase. *FASEB J* 21, 1539-46.
- Pavlovic, D., Fuller, W. ja Shattock, M. J. (2013a). Novel regulation of cardiac Na pump via phospholemman. *J Mol Cell Cardiol* 61, 83-93.
- Pavlovic, D., Hall, A. R., Kennington, E. J., Aughton, K., Boguslavskyi, A., Fuller, W., Despa, S., Bers, D. M. ja Shattock, M. J. (2013b). Nitric oxide regulates cardiac intracellular Na(+) and Ca(2)(+) by modulating Na/K ATPase via PKCepsilon and phospholemman-dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 61, 164-71.
- Periasamy, M. ja Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 35, 430-42.
- Rahimtoola, S. H. (2004). Digitalis therapy for patients in clinical heart failure. *Circulation* 109, 2942-6.

Rando, T. A., Horton, J. C. ja Layzer, R. B. (1992). Wolfram syndrome: evidence of a diffuse neurodegenerative disease by magnetic resonance imaging. *Neurology* 42, 1220-4.

Schwinger, R. H., Bundgaard, H., Muller-Ehmsen, J. ja Kjeldsen, K. (2003). The Na, K-ATPase in the failing human heart. *Cardiovasc Res* 57, 913-20.

Schwinger, R. H., Wang, J., Frank, K., Muller-Ehmsen, J., Brixius, K., McDonough, A. A. ja Erdmann, E. (1999). Reduced sodium pump $\alpha 1$, $\alpha 3$, and $\beta 1$ -isoform protein levels and Na^+ , K^+ -ATPase activity but unchanged Na^+ - Ca^{2+} exchanger protein levels in human heart failure. *Circulation* 99, 2105-12.

Segall, L., Daly, S. E. ja Blostein, R. (2001). Mechanistic basis for kinetic differences between the rat $\alpha 1$, $\alpha 2$, and $\alpha 3$ isoforms of the Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 276, 31535-41.

Smith, C. J., Crock, P. A., King, B. R., Meldrum, C. J. ja Scott, R. J. (2004). Phenotype-genotype correlations in a series of wolfram syndrome families. *Diabetes Care* 27, 2003-9.

Strom, T. M., Hortnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K. D. ja Meitinger, T. (1998). Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet* 7, 2021-8.

Sutt, S., Altpere, A., Reimets, R., Visnapuu, T., Loomets, M., Raud, S., Salum, T., Mahlapuu, R., Kairane, C., Zilmer, M. ja Vasar, E. (2015). *Wfs1*-deficient animals have brain-region-specific changes of Na^+ , K^+ -ATPase activity and mRNA expression of $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits. *J Neurosci Res* 93, 530-7.

Swift, M. ja Swift, R. G. (2000). Psychiatric disorders and mutations at the Wolfram syndrome locus. *Biol Psychiatry* 47, 787-93.

Zatyka, M., Da Silva Xavier, G., Bellomo, E. A., Leadbeater, W., Astuti, D., Smith, J., Michelangeli, F., Rutter, G. A. ja Barrett, T. G. (2015). Sarco(endo)plasmic reticulum ATPase is a molecular partner of Wolfram syndrome 1 protein, which negatively regulates its expression. *Hum Mol Genet* 24, 814-27.

Zatyka, M., Ricketts, C., da Silva Xavier, G., Minton, J., Fenton, S., Hofmann-Thiel, S., Rutter, G. A. ja Barrett, T. G. (2008). Sodium-potassium ATPase 1 subunit is a molecular partner of

Wolframin, an endoplasmic reticulum protein involved in ER stress. *Hum Mol Genet* 17, 190-200.

Taub, M., Springate, J. E. ja Cutuli, F. (2010). Targeting of renal proximal tubule Na,K-ATPase by salt-inducible kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 393, 339-44.

Tedeschi, H. (1974). *Cell physiology: molecular dynamics*. edit. Trans. Ed.)^Eds.). vols, Academic Press, New York,.

Therien, A. G. ja Blostein, R. (2000). Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C541-66.

Therien, A. G., Nestor, N. B., Ball, W. J. ja Blostein, R. (1996). Tissue-specific versus isoform-specific differences in cation activation kinetics of the Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 271, 7104-12.

Thevenod, F. ja Friedmann, J. M. (1999). Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of Na⁺/K⁺-ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. *FASEB J* 13, 1751-61.

Tiger, G. ja Fowler, C. J. (1991). The Na⁺, K⁺-ATPase inhibitor ouabain and the Na⁺ ionophore monensin have opposite effects upon carbachol-stimulated inositol phospholipid breakdown in rat cerebral cortical miniprisms. *Cell Signal* 3, 209-13.

Tokhtaeva, E., Clifford, R. J., Kaplan, J. H., Sachs, G. ja Vagin, O. (2012). Subunit isoform selectivity in assembly of Na,K-ATPase alpha-beta heterodimers. *J Biol Chem* 287, 26115-25.

Trost, S. U., Belke, D. D., Bluhm, W. F., Meyer, M., Swanson, E. ja Dillmann, W. H. (2002). Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 51, 1166-71.

Wang, X., Armando, I., Upadhyay, K., Pascua, A. ja Jose, P. A. (2009). The regulation of proximal tubular salt transport in hypertension: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18, 412-20.

Vasilets, L. A., Fotis, H. ja Gartner, E. M. (1997). Regulatory phosphorylation of the Na⁺/K⁺-ATPase from mammalian kidneys and *Xenopus* oocytes by protein kinases. Characterization of the phosphorylation site for PKC. *Ann N Y Acad Sci* 834, 585-7.

Ver Heyen, M., Heymans, S., Antoons, G., Reed, T., Periasamy, M., Awede, B., Lebacqz, J., Vangheluwe, P., Dewerchin, M., Collen, D., Sipido, K., Carmeliet, P. ja Wuytack, F. (2001). Replacement of the muscle-specific sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform SERCA2a by the nonmuscle SERCA2b homologue causes mild concentric hypertrophy and impairs contraction-relaxation of the heart. *Circ Res* 89, 838-46.

Wolfram, D. J. ja Wagener, H. P. (1938). Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases. *Mayo Clin. Proc.* 13, 715-718.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Helis Guske (sünnikuupäev: 21.05.1992),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Katioonpumpade uurimine Wfs1-puudulikkusega hiirte südames ja neerudes,

mille juhendajad on Silva Sütt, Ants Kurg ja Alina Altpere,

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 27.05.2016 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2016